

Huber & Schüssler · Truderinger Straße 246 · 81825 München  
 Europäisches Patentamt  
 80298 München

Truderinger Straße 246  
 D-81825 München  
 Tel.: \*\*49. 89. 43 77 88 - 0  
 Fax: \*\*49. 89. 43 77 88 99  
 munich@huber-schuessler.info  
 www.huber-schuessler.com

Dr. Bernard Huber  
 Dipl.-Biologe  
 Dr. Andrea Schüssler  
 Dipl.-Chemikerin

In Zusammenarbeit mit  
 Rechtsanwälten  
 Dr. Wolfram Städtler  
 Stephan Biagosch

16. Januar, 2004

Aktenzeichen: PCT/DE03/00124  
 Anmelder: DKFZ  
 Unser Zeichen: K 3125 - sch / tz

### Auf den Bescheid vom 17.11.2003

#### 1. Antrag

Es wird ein eingehender schriftlicher Sachbescheid beantragt, bevor der Vorläufige Internationale Prüfbescheid erlassen wird.

#### 2. Patentansprüche

Es wird hiermit ein geänderter Patentanspruch 1 eingereicht.

Anspruch 1 b) ist nun zusätzlich dadurch gekennzeichnet, dass die einzubringende Verbindung eine PNA ist, die die Transkription eines Gens hemmt. Diese Änderung ist gestützt von Seite 6, letzter Absatz bis Seite 7, Zeile 5 der Beschreibung.

Anspruch 7 ist gestrichen und die Ansprüche 8 bis 17 sowie deren Rückbezüge wurden entsprechend neu nummeriert.

HypoVereinsbank München  
 (BLZ 700 202 70)  
 4410221 220  
 IBAN  
 DE 34 7002 0270 4410 2212 20  
 SWIFT (BIC): HYVEDEMMXXX

Deutsche Bank München  
 (BLZ 700 700 24)  
 4 362 000  
 IBAN  
 DE 85 7007 0024 0436 2000 00  
 SWIFT (BIC): DEUTDEDDBMUC

### 3. Gegenstand der Ansprüche

Anspruch 1 betrifft nun ein Konjugat, das

- einen die prokaryontische Zellwand pasierenden Transportvermittler; und
- eine gegen ein Gen des Prokaryonten, d.h. gegen die DNA, gerichtete PNA aufweist.

### 4. Neuheit

Die Ansprüche sind neu gegenüber dem im Internationalen Recherchenbericht zitierten Stand der Technik.

**4.1** PIPKORN, R. ET AL: "Peptide carrier for efficient drug transport into living cells" (American Peptide Symposium, San Diego, 2001) beschreibt die Anwendung eines Peptidkonjugats bei Krebszellen, d.h. eukaryontischen Zellen.

**4.2** Die WO 00/68265 (UNIV. OF CALIFORNIA) beschreibt die Anwendung des Defensins als anti-mikrobiellen Wirkstoff zur Behandlung von Infektionen. Weder die Verwendung von Defensin als Carriermolekül, noch der kombinierte Einsatz von Defensin mit einem weiteren anti-mikrobiellen Agens wird erwähnt.

**4.2** Die WO 96/11205 (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) beschreibt eine Vielzahl von PNA-Konjugaten, wobei keine Konjugate offenbart werden, die einen Transportvermittler für prokaryontische Zellmembrane umfassen.

**4.3** Die WO 01/05432 (DKFZ) beschreibt Peptidkonjugate zum Wirkstofftransport in Zellen. Die offenbarten Transportvermittler eignen sich nicht für prokaryontische Zellen. Es werden keine Wirkstoffe beschrieben, die gegen Prokaryonten gerichtet sind.

**4.4** GOOD L. ET AL: "Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates"

(Nature Biotechnology, Nr. 4, 2001, pp. 360-364) beschreiben Peptid-PNA-Konjugate zur Behandlung bakterieller Infektionen.

Die beschriebenen Konjugate umfassen ein schwach bakterizides, synthetisches Peptid und eine gegen die mRNA oder rRNA der E.coli gerichtete PNA.

**4.5** Die WO 96/03519 (DEMETER BIOTECH LTD) behandelt Fusionspeptide aus Ubiquitin und lytischen Peptiden, z.B. Defensin. Diese Konstrukte sind nicht toxisch für Prokaryonten, da Bakterien das eukaryontische Ubiquitin nicht abspalten können, um das lytische Peptid freizusetzen.

**4.6** Die WO 99/65506 (MICROLOGIX BIOTECH INC.) beschreibt die Modifikation von kationischen Peptiden, z.B. Defensin, mit Polyoxyalkylen, um die pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern und hydrophobe Substanzen in die Zelle zu transportieren. Beschrieben werden nur Konjugate aus den kationischen Peptiden und Zytostatika, die keine PNA sind.

**4.7** NIELSEN P.E.: "Peptide nucleic acids as therapeutic agents", Current Opinion in Structural Biology, Nr. 3, 1999, pp. 353-35 beschreibt eine Antisense-Strategie gegen Ampicillin resistente E. coli durch PNA-Konstrukte, die gegen die mRNA des Resistenzgens gerichtet sind (Seite 355, links unten).

## **5. Erfinderische Tätigkeit**

Als nächstliegender Stand der Technik wird das Dokument von GOOD L. ET AL: "Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates" (Nature Biotechnology, Nr. 4, 2001, pp. 360-364) angesehen, in dem eine klassische Antisense-Strategie beschrieben wird, bei der die PNA gegen die mRNA bzw. rRNA gerichtet ist.

Der Gegenstand der Anmeldung unterscheidet sich demgegenüber darin, dass die in

den Prokaryonten einzubringende PNA direkt gegen das Gen, d.h. dessen DNA, gerichtet ist und die Transkription der DNA hemmt. Mit diesen Konjugaten wird eine Anti-Gen-Strategie verfolgt, bei der das Gen selbst und nicht die RNA das Ziel ist.

Die Anti-Gen-Strategie hat sich als besonders vorteilhaft für die Behandlung prokaryontischer Infektionen erwiesen. Durch die Hybridisierung der PNA mit der DNA kann das Zielgen dauerhaft und stabil gehemmt werden. Das hat den therapeutischen Vorteil, dass – gegenüber der Verwendung von auf die RNA gerichteter PNA – einmalige und niedrig dosierte Wirkstoffgaben ausreichen und unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund höherer Dosen ausbleiben. Zudem können die Konjugate gemäß der Erfindung im Falle der Re-Sensibilisierung für ein Antibiotikum der Antibiotikatherapie vorgelegt werden und müssen nicht gemeinsam mit dem Antibiotikum verabreicht werden.

Ausgehend von der Schrift von Good L. et al. war es für den Fachmann nicht nahe liegend, eine auf die bakterielle DNA gerichtete PNA mit einem Peptid zu konjugieren, das die prokaryotische Zellwand passieren kann, um prokaryotische Infektionen zu behandeln. Good L. et al., wie sämtliche zum Anmeldezeitpunkt bekannten Applikationen, ist auf das Antisense-Prinzip mit einer RNA als Ziel beschränkt. Hierbei wird nur ein transienter Effekt erzielt, der die Proteinbiosynthese, nicht jedoch wie in der Anmeldung die Transkription blockiert, und höhere, mehrmalige Applikationsdosen erfordert. Ebenso berichtet Nielsen (1999) auf Seite 355, linke Spalte, letzte beiden Absätze nur über auf RNA gerichtete Anwendungen, beispielsweise zur Re-Sensibilisierung von Amphotericin-resistanten *E.coli* und führt deshalb nicht zum Gegenstand der Ansprüche.

Da zum Anmeldezeitpunkt die Anwendung von PNA, die auf bakterielle DNA gerichtet ist und dessen Transkription hemmt, nicht beschrieben war, war die vorteilhafte Wirkung dieser Vorgangsweise, d.h. geringere und nur einmalige Applikationsdosen, nicht aus dem Stand der Technik bekannt. Ein Fachmann hätte daher keinen Anreiz vorgefunden eine PNA einzusetzen, die auf die bakterielle DNA gerichtet

ist, da a) die damit verbundenen Vorteile und Wirkungen nicht bekannt waren und b) im Stand der Technik ausschließlich Antisense-Reagenzien, die nur auf die RNA gerichtet sind, gegen Prokaryonten verwendet wurden. Deshalb war der Gegenstand des Anspruchs 1 nicht naheliegend.

Patentanwalt

  
Dr. Andrea Schüßler

Anlage:

- geänderter Satz Patentansprüche 1 bis 16 (Änderungen markiert)
- geänderter Satz Patentansprüche 1 bis 16 in Reinschrift

### Geänderte Patentansprüche

1. Konjugat, das zur Behandlung prokaryontischer Infektionen geeignet ist und die folgenden Komponenten aufweist:

- (a) einen die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler; und
- (b) eine in den Prokaryonten einzubringende und gegen diese gerichtete Peptid-Nukleinsäure (PNA), die die Transkription eines prokaryontischen Gens hemmt.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Prokaryont ein Bakterium ist.

3. Konjugat nach Anspruch 2, wobei das Bakterium ein humanpathogenes Bakterium ist.

4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Phagen-Holin-Protein umfaßt, das eine der in Figur 3 dargestellten Aminosäuresequenzen umfaßt oder ein Fragment oder eine Variante davon, das (die) die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Defensin umfaßt.

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Peptid-Nukleinsäure (PNA) gegen ein Gen gerichtet ist, das eine Antibiotikum-Resistenz verleiht.

8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei die Antibiotikum-Resistenz

eine Penicillin-, Ampicillin-, Kanamycin- oder eine Tetracyclin-Resistenz ist.

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das folgende Struktur hat: Transportvermittler-Spacer-einzubringende Verbindung.

10. Konjugat oder Konjugat-Gemisch nach Anspruch 9, wobei der Spacer Polylysin, Polyglycin oder Poly(Glycin/Lysin) ist.

11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer über eine spaltbare Disulfidbrücke mit dem Transportvermittler verknüpft ist.

12. Konjugat nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei die Peptid-Nukleinsäure die Sequenz  $H_2N-ATTGTTAGATTCAT-COOH$  umfaßt.

13. Arzneimittel, ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 12 enthaltend.

14. Arzneimittel nach Anspruch 13, außerdem mindestens ein Antibiotikum enthaltend, für das der Prokaryont durch die Verabreichung des Konjugats wieder sensibilisiert wurde.

15. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder der in Anspruch 14 definierten Zusammensetzung zur Behandlung einer prokaryontischen Infektion.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die prokaryontische Infektion durch einen Prokaryonten verursacht ist, der eine Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum aufweist.

### Geänderte Patentansprüche

1. Konjugat, das zur Behandlung prokaryontischer Infektionen geeignet ist und die folgenden Komponenten aufweist:

- (a) einen die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler; und
- (b) eine in den Prokaryonten einzubringende und gegen diese gerichtete Peptid-Nukleinsäure (PNA), die die Transkription eines prokaryontischen Gens hemmt.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Prokaryont ein Bakterium ist.

3. Konjugat nach Anspruch 2, wobei das Bakterium ein humanpathogenes Bakterium ist.

4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Phagen-Holin-Protein umfaßt, das eine der in Figur 3 dargestellten Aminosäuresequenzen umfaßt oder ein Fragment oder eine Variante davon, das (die) die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Defensin umfaßt.

~~7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die einzubringende Verbindung eine gegen die Expression eines Gens gerichtete Peptid-Nukleinsäure (PNA) ist.~~

78. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 67, wobei die

Infektion durch einen Prokaryonten verursacht ist, der eine Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum aufweist.